论著

文章编号:1000-5404(2010)23-2524-03

刚地弓形虫RH株对小鼠胎盘滋养细胞凋亡的影响

葛 璞[1,2],车 艺[1,2],林 玲[1,2],黄开顺[3],彭 净[2,4],叶 彬[2,4] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院病理生理学教研室[1],基础医学院肿瘤与分子医学中心[2],生命科学院[3],基础医学院病原生物学教研室[4])

【摘要】 目的 通过研究刚地弓形虫强毒株RH株对体外培养的孕期小鼠胎盘滋养层细胞凋亡的影响,初步探讨不同毒力虫株引起病理妊娠的机制。方法 将小鼠胎盘滋养层细胞分别接种于不同细胞培养瓶,对照组加入DMEM培养基孵育,实验组加入相同体积不同数量(2×10^6/ml、4×10^6/ml、8×10^6/ml)弓形虫速殖子培养2、4、8 h,Annexin-V-FITC/PI染色细胞后上流式细胞仪检测各个时间点细胞凋亡率变化;荧光显微镜观察细胞形态改变情况;Western blot分析凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的表达或活性。结果 流式细胞仪检测弓形虫感染后的滋养层细胞凋亡率较对照组有下降趋势($P<0.05$),呈量效依赖性,弓形虫数量8×10^6/ml实验组8 h凋亡率最低,为(15.81±0.19)%;荧光显微镜观察到8 h不同数量实验组滋养细胞凋亡形态改变情况,各组均有典型的早期凋亡细胞:细胞膜着绿色,细胞核拒染。随着弓形虫感染数量增加,凋亡细胞数目有所减少。Western blot检测刚地弓形虫RH株作用于滋养层细胞8 h后实验组的Bax、Bcl-2蛋白表达较对照组分别有明显的降低与升高($P<0.05$)。结论 刚地弓形虫RH株可抵抗体外培养的孕期小鼠滋养细胞正常凋亡,其机制可能与滋养细胞Bax表达下调和Bcl-2表达上调有关。

【关键词】 刚地弓形虫RH株;滋养细胞;凋亡;Bax;Bcl-2
【中图法分类号】 R321.4;R329.28;R382.5 【文献标志码】 A

Effect of *Toxoplasma gondii* RH strain on apoptosis of mouse placental trophoblastic cells

Ge Pu[1,2], Che Yi[1,2], Lin Ling[1,2], Huang Kaishun[3], Peng Jing[2,4], Ye Bin[2,4] ([1]Department of Pathophysiology, [2]Center for Tumor and Molecular Medicine, [4]Department of Pathobiology, College of Basic Medical Sciences, [3]College of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) RH strain on mouse placental trophoblastic cells *in vitro* and the mechanism of *Toxoplasma gondii* RH strain underlying pathological pregnancy. Methods Mouse placental trophoblastic cells were inoculated into different cell culture plates and divided into control group and experimental group. Trophoblastic cells in control group were incubated in DMEM and those in experimental group were incubated with tachyzoites at a concentration of 2×10^6/ml, 4×10^6/ml, and 8×10^6/ml for 2, 4 and 8 h, respectively. Apoptosis of trophoblastic cells was detected by FCM with Annexin-V-FITC/PI staining. Changes in cell morphology were observed under fluorescence microscope. Expression or activity of apoptosis-related Bax and Bcl-2 proteins in trophoblastic cells was detected by Western blotting. Results FCM showed that the apoptosis rate of trophoblastic cells infected with *T. gondii* RH strain was decreased in a dose-dependent manner and was lower in experimental group than in control group, with the lowest apoptosis rate of (15.81±0.19)% observed in experimental group 8 h after the concentration of tachyzoites was increased to 8×10^6/ml. Typical early apoptotic cells were found under fluorescence microscope with their membrane green stained and their nuclei not stained. Western blotting showed that the expression levels of Bcl-2 and Bax proteins was higher in experimental group than in control group ($P<0.05$). Conclusion *T. gondii* RH strain can resist apoptosis of mouse placental trophoblastic cells *in vitro* by down-regulating the Bax expression and up-regulating the Bcl-2 expression.

【Key words】 *Toxoplasma gondii* RH strain; trophoblastic cells; apoptosis; Bax; Bcl-2

Corresponding author: Ye Bin, Tel: 86-23-68894568, E-mail: yebina@sohu.com

细胞凋亡是人类胚胎正常发育过程中一个最基本的生理现象,它能清除异常胚胎细胞及增强孕期的免疫耐受性,同时凋亡是滋养层细胞实现生长更替的重要途径,因此孕期滋养层细胞的凋亡率改变,可能导致流产或损害胚胎[1]。刚地弓形虫是人类宫内感染致

【通信作者】 叶 彬,电话:(023)68894568,E-mail:yebina@sohu.com

胎儿畸形的四大病原体之一，孕期感染弓形虫可致流产、早产、死产、胎儿畸形等不良妊娠结局。不同虫株感染率有很大差异，目前通过胎盘垂直传染率最高的虫株主要有 2 种，一种是刚地弓形虫强毒株 RH 株，另一种是弱毒株 ME49 株。本实验探讨强毒株 RH 株入侵孕期小鼠胎盘滋养细胞后对滋养细胞凋亡情况的影响，为探讨不同毒力虫株引起病理妊娠的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刚地弓形虫 RH 株由山西医科大学病原生物学教研室提供，BALB/c 小鼠体质量(20 ± 2) g[由重庆医科大学实验动物中心提供，SCXK(渝) 2007-0001]，DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司)，CF-11 纤维素(英国 Whatman 公司)，细胞凋亡 Annexin-V-FITC 染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)，RIPA 裂解液(北京百泰克生物技术有限公司)，兔抗鼠 Bax、Bcl-2 单克隆抗体，硝酸纤维素膜，HRP-羊抗鼠 IgG 均为 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 弓形虫速殖子的收集 含 3×10^6 条弓形虫速殖子接种 BALB/c 小鼠，转种 72 h 后用生理盐水收集腹腔液，3 000 r/min 离心 8 min 去上清洗涤 2 次后，加 pH 7.2 PBS 制备虫体悬液。CF-11 纤维素加 PBS 溶液搅拌均匀，静置于 4 ℃冰箱过夜后装柱高约 3 cm，保持柱面有一定液体，将分离到的弓形虫悬液快速过柱，收集滤液，3 000 r/min 离心 8 min 去上清，沉淀为虫体，收集弓形虫虫体于镜下计数后用完全 RPMI1640 重悬，调整速殖子数量为 2×10^6/ml、4×10^6/ml、8×10^6/ml。

1.2.2 小鼠胎盘滋养细胞的制备与培养 取动情期雌性 BALB/c 小鼠和 10 周龄雄性 BALB/c 小鼠，等比例合笼过夜。雌鼠出现阴道栓标志交配成功，为受孕 0.5 d。于受孕 7.5 d 时，无菌取孕鼠子宫，剥出晶胚，从胎外外胚层连接处将外胎盘锥切下。滴加浓度为 0.1 μg/ml 的 LN 100 μl 于盖玻片，风干后置于 6 孔板底，将外胎盘锥接种于盖玻片上，加入 DMEM 培养液 2 ml/孔，于 37 ℃、含体积分数为 5% CO_2 条件下培养 3 d，此时可见大量滋养层细胞游出贴壁生长。剔除外胎盘锥组织块，以 2 mg/ml 胰蛋白酶消化贴壁细胞，进行传代培养[2]。

1.2.3 实验分组 分为对照组及实验组，对照组取小鼠胎盘滋养细胞(5×10^5/ml)接种于 100 ml 培养瓶内加入 DMEM 培养基孵育，实验组取同样条件下的滋养细胞，分别加入相同体积不同数量(2×10^6/ml、4×10^6/ml、8×10^6/ml)弓形虫速殖子培养不同时间(2、4、8 h)作比较。

1.2.4 流式细胞仪测细胞凋亡率 不同组在不同时间段分别收集 2×10^5 细胞，离心去培养基，PBS 洗涤 2 次(2 000 r/min，离心 5 min)，加入 500 μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞，再依次加入 5 μl Annexin-V-FITC、5 μl PI 混匀，室温避光反应 10 min 后用 FACScan 检测凋亡率，共测 5 次，结果取平均值。

1.2.5 荧光显微镜观察细胞凋亡形态 按照 1.2.4 的方法取 8 h 后弓形虫感染的滋养层细胞制备细胞悬液，分别加入 5 μl Annexin-V-FITC 与 5 μl PI 混匀，室温避光反应 10 min 后荧光显微镜下观察细胞情况。

1.2.6 Western blot 检测 用裂解液提取细胞总蛋白，行 SDS-PAGE 电泳后转至硝酸纤维膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，按比例分别加入一抗兔抗鼠 Bax、Bcl-2 单克隆抗体，4 ℃过夜。洗涤 3 次后，再加入二抗室温孵育 2 h，滴加 ECL 化学发光剂，凝胶扫描仪对蛋白条带进行扫描。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，2 组间均数比较采用 t 检验。所有数据用 SSPS 10.0 统计软件作处理。

2 结果

2.1 流式细胞仪测细胞凋亡情况

将实验组与对照组的滋养层细胞用 Annexin-V-FITC 与 PI 双染后，FCM 分析细胞凋亡情况，显示在各时间点实验组凋亡率均较空白对照组显著降低($P<0.05$，表 1)。

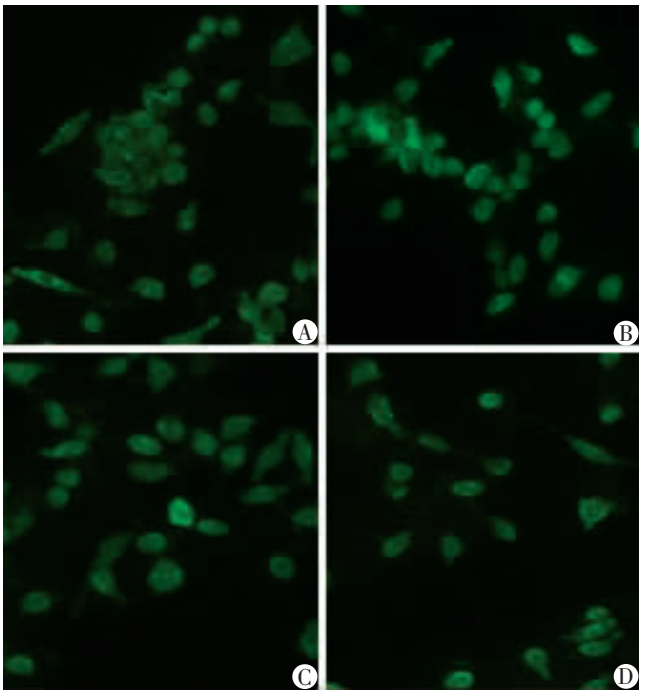
表 1 不同数量的刚地弓形虫作用滋养层细胞不同时间后细胞的凋亡率比较(%，$\bar{x}\pm s$)

组别	2 h	4 h	8 h
对照组	25.32 ± 0.23	28.73 ± 0.08	26.22 ± 0.41
实验组			
2×10^6/ml	20.29 ± 0.32[a]	18.48 ± 0.21[a]	18.05 ± 0.07[a]
4×10^6/ml	18.35 ± 0.15[a]	17.03 ± 0.42[a]	17.56 ± 0.33[a]
8×10^6/ml	17.15 ± 0.05[a]	16.22 ± 0.02[a]	15.81 ± 0.19[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 荧光显微镜观察

将 8 h 后的对照组与弓形虫 RH 株实验组滋养层细胞置荧光显微镜下观察，可见各组均有典型的早期凋亡细胞，细胞膜着绿色，细胞核拒染。随着弓形虫感染数量增加，凋亡细胞数目有所减少(图 1)。

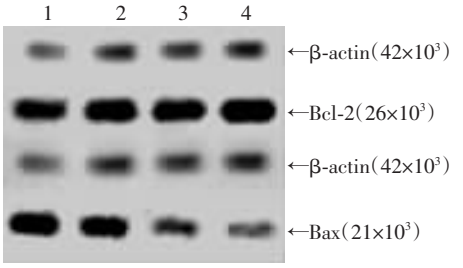


A：对照组；B～D：分别为 2×10^6/ml、4×10^6/ml、8×10^6/ml 弓形虫 RH 株感染实验组

图 1 荧光显微镜观察各组滋养层细胞在弓形虫作用 8 h 凋亡形态学变化 (×200)

2.3 Western blot 检测

对照组滋养层细胞可见 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。不同数量弓形虫 RH 株感染 8 h 后，Bcl-2 表达条带呈浓度依赖性升高，Bax 表达条带呈浓度依赖性下降（$P<0.05$，图 2、表 2）。



1：对照组 2：2×10^6/ml 实验组 3：4×10^6/ml 实验组 4：8×10^6/ml 实验组

图 2 Western blot 检测刚地弓形虫 RH 株作用于滋养层细胞 8 h 后对 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

表 2 刚地弓形虫作用于滋养层细胞 8 h 后对 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin
对照组	1.62±0.03	0.89±0.03
实验组		
2×10^6/ml	1.34±0.07[a]	0.95±0.06[a]
4×10^6/ml	1.07±0.02[a]	1.12±0.03[a]
8×10^6/ml	0.98±0.04[a]	1.42±0.05[a]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

3 讨论

凋亡在胚胎发育、分化和成熟的过程中具有重要的作用，能够通过自稳机制有序地调节细胞的生死[3]。胚胎发育过程中，完成阶段使命的某些细胞必须死亡才可能启动或激发下一阶段的发育，这是一种正常而重要的生理功能[4]。在整个妊娠期，时空调控的细胞凋亡在母体对胎儿的免疫耐受及绒毛发育中发挥关键作用。Smith 等[5]研究证实胎盘中超过 50% 的细胞凋亡发生在滋养层细胞，适度的细胞凋亡有利于滋养层细胞正常生长更替。相反，有害因素诱发细胞自稳机制失衡，改变了孕期滋养层细胞的正常凋亡率，则可导致流产或胚胎的损害。

弓形虫是一种专性细胞内寄生的原虫，妊娠妇女感染弓形虫后可经胎盘垂直传播给胎儿，导致多种不良妊娠结局。有关孕期弓形虫宫内感染的研究一直为国内外专家所重视，但大多停留在对胚胎发育的有关组织器官层面[6-11]，对相关细胞的具体研究还比较欠缺。

本研究选用传播率高、毒力较强的刚地弓形虫 RH 株体外复制感染小鼠胎盘滋养层细胞的模型，滋养细胞直接来自原代组织块培养，能较真实反应体内状态；同时，滋养层细胞保持旺盛的细胞分裂，通过体外培养可为本实验细胞凋亡率研究提供符合要求的细胞[12]。本研究结果初步表明，刚地弓形虫 RH 株能通过改变滋养细胞 Bax 和 Bcl-2 表达抵抗小鼠胎盘滋养细胞的正常凋亡，这与前期我们所做的刚地弓形虫弱毒株 ME49 株感染小鼠胎盘滋养细胞后能够促使细胞凋亡的结果正好相反[13]，证实了不同刚地弓形虫虫株虽然都可引起不良妊娠，但其机制并不相同[14]。这为我们更深入理解弓形虫与宿主细胞之间相互作用及孕期弓形虫病防治提供科学依据。

参考文献：

[1] Perez-Perez A, Maymo J, Duenas J L, *et al*. Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 477(2): 390-395.

[2] 刘超，孙宗全，陈家军，等. 输注负载胎盘滋养层细胞抗原的受者 aaDC 延长小鼠移植心的存活时间[J]. 中华器官移植杂志，2009，30(1)：5-9.

[3] Mirkes P E. 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development[J]. Teratology, 2002, 65(5): 228-239.

[4] 常青，赵泽文，李泽桂，等. PCB153 诱导小鼠胚胎细胞凋亡对胚胎生长发育的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(19)：1838-1840.

[5] Smith S C, Baker P N, Symonds E M. Placental apoptosis in normal human pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177(1): 57-65.

[6] 赵晋英，侯玉英，李艳伟，等. 孕中期弓形虫感染对孕鼠血红系列及血清铁蛋白的影响[J]. 山西医科大学学报，2008，39(1)：15-17.

[7] Pezerico S B, Langoni H, Da-Silva A V, *et al*. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model[J]. Exp Parasitol, 2009, 123(2): 168-172.

[8] Senegas A, Villard O, Neuville A, *et al*. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferorn-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofoetal interface[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(4): 481-487.

[9] 陈莉萍，谭布珍，冯琼，等. 滋养层细胞凋亡与稽留流产的关系[J]. 中国妇幼保健，2008，23(26)：3712-3716.

[10] Miller C M, Boulter N R, Ikin R J, *et al*. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii* [J]. Int J Parasitol, 2009, 39(1): 23-39.

[11] Stumbo A C, Cortez E, Rodrigues C A, *et al*. Mitochondrial localization of non-histone protein HMGB1 during human endothelial cell-*Toxoplasma gondii* infection[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(2): 235-238.

[12] 施琼，朱旦，王箭，等. 原代绒毛滋养层细胞的培养及转染研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(12)：1203-1206.

[13] 葛璞，车艺，林玲，等. 刚地弓形虫 ME49 株对体外培养的小鼠胎盘滋养细胞凋亡的影响[J]. 第二军医大学学报，2010，31(5)：485-488.

[14] Angeloni M B, Silva N M, Castro A S, *et al*. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types[J]. Placenta, 2009, 30(9): 785-791.

（收稿：2009-12-15 修回：2010-01-05）

（编辑 龙 亮）